

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)24-2214-03

缺血后处理减轻大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤最佳方案

孙 静,董海龙,栾 琪,赵 鞏,路志红,熊利泽 (第四军医大学西京医院麻醉科,陕西 西安 710033)

Optimal protocol of ischemic postconditioning against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

SUN Jing, DONG Hai-Long, LUAN Qi, ZHAO Hui, LU Zhi-Hong, XIONG Li-Ze

Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To investigate the optimal protocol of ischemic postconditioning (IP) against focal cerebral ischemia-reperfusion injury, and compare the effect of IP with that of ischemic preconditioning (IPC). **METHODS:** To confirm the optimal protocol of IP, 60 male SD rats weighing 290-310 g were randomly assigned to 6 groups ($n = 10$ each): control group and IP groups with different time intervals (15, 30 s, 1, 2 and 5 min). IP was performed by three cycles of reperfusion/ischemia (R/I) at different time intervals (15, 30 s, 1, 2 and 5 min respectively) after middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 90 min. To compare the effect of IP with that of IPC, 30 male SD rats weighing 290-310 g were randomly assigned to 3 groups ($n = 10$ each): control group, IP-15s and IPC. The rats in IP group were subjected to 3 cycles of R/I after 90 min MCAO at the best time interval (15 s). The rats in IPC group were subjected to 20 min MCAO 24 h before 90 min MCAO. The neurological deficit scores (NDS) were evaluated 24 h after reperfusion, and the 90 animals were sacrificed. Infarct volume, as a percentage of volume at normal cerebral hemisphere, was determined by 2, 3, 5-triPhenyltetrazolium (TTC) staining. **RESULTS:** NDS was significantly lower and the infarct volume was significantly smaller in IP-15 s group [$(34.0 \pm 4.8)\%$] compared to that of control group [$(58.9 \pm 12.2)\%$, $P < 0.01$] 24 h after the reperfusion. The NDS in IP-15 s group and IPC group were better than that in control group. The infarct volume in IP-15 s group [$(36.1 \pm 10.3)\%$] was larger than that in IPC group [$(26.8 \pm 3.3)\%$, $P < 0.01$]. **CONCLUSION:** The optimal protocol of IP to induce ischemic tolerance in brain is three cycles of R/I (15 s/15 s). And the neuroprotection in-

duced by IPC is stronger than that by IP.

【Keywords】 ischemic postconditioning; ischemic preconditioning; reperfusion injury; brain

【摘要】目的: 探寻缺血后处理(IP)对大鼠局灶性脑缺血损伤保护作用的最佳时间, 比较该处理方案与缺血预处理(IPC)脑保护效应。方法: IP最佳时间确定实验分组 60 只雄性SD大鼠, 随机分为6组($n = 10$)。对照组, 行单纯缺血再灌注; IP-15 s, 30 s, 1 min, 2 min 和 5 min 不同时间点组, 分别于大脑中动脉线栓阻断(MCAO) 90 min 后, 再灌注 15 s, 30 s, 1 min, 2 min 和 5 min, 缺血 15 s, 30 s, 1 min, 2 min 和 5 min, 反复三次, 组间比较得出 IP 最佳时间。比较 IP 最佳时间与 IPC 脑保护效应实验分组 30 只雄性SD大鼠, 随机分为3组($n = 10$)。对照组, IP-15 s 组和 IPC 组, 预先阻断大脑中动脉 20 min, 再灌注 24 h 后行 MCAO 90 min。上述实验 90 只动物经再灌注 24 h 后进行神经功能障碍评分。取大脑行 2, 3, 5-氯化三苯四唑(TTC)染色确定脑梗死容积百分比, 并行统计学分析。结果: 再灌注 24 h 后, 在 IP 最佳时间的确定实验中, IP-15 s 组神经功能评分和脑梗死容积($34.0 \pm 4.8\%$)明显低于对照组($58.9 \pm 12.2\%$), $P < 0.01$]; 在 IP 与 IPC 脑保护效应比较实验中, IP-15 s 和 IPC 的神经功能评分与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$), 但 IP-15s 脑梗死容积($36.1 \pm 10.3\%$)大于 IPC 组($26.8 \pm 3.3\%$), $P < 0.01$]。结论: IP 对大鼠局灶性脑缺血损伤保护作用的最佳时间为 15 s 再灌注/缺血, 反复三次, IP 的脑保护效应弱于 IPC。

【关键词】 缺血后处理, 缺血预处理, 再灌注损伤, 脑

【中图分类号】 R614-33 **【文献标识码】** A

0 引言

脑缺血可造成神经元的不可逆性损伤, 寻找有效预防和治疗神经损伤的方法是当前研究的难点和热点。缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)可减轻脑的再灌注损伤, 但由于脑缺血的发生具有不可预知性, 故其应用具有一定的局限性^[1]。有学者在兔心肌缺血再灌注模型发现, 冠脉阻断 40 min 后间断开放和阻断冠脉, 可明显减小梗死面积, 以此提出“缺血后处理”(ischemic postconditioning, IP)的概念^[2]。既往研究证实脑组织缺血再灌注前, 行短暂的重复缺血亦可减轻再灌注损伤^[3]。但 IP 选用何种时长和间隔才产生最显著的脑保护效应, 而这种保护效应与预处理比较孰强孰弱, 目前少见报道。本研究旨在探讨

收稿日期 2007-09-06; 接受日期 2007-11-10

基金项目 国家自然科学基金(30471664)

通讯作者 熊利泽。Tel: (029) 84775337 Email: mazuike@fmmu.edu.cn

作者简介 孙 静, 硕士生(导师熊利泽), 医师。Tel: (029) 84775343

Email: Wajingjing@hotmail.com

在体情况下 IP 的最佳时间方案, 并比较与预处理脑保护效应的强弱, 为其的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康雄性 SD 大鼠 90 只, 体质量 290 ~ 310 g (由第四军医大学实验动物中心提供) 3-0 尼龙线(日本 Ethicon 公司); DC-240 型数码相机(美国 Kodak 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 IP 最佳时间确定实验分组 SD 大鼠 60 只, 随机分为 6 组, 每组 10 只。对照组: 行单纯缺血再灌注 IP-15 s 30 s 1 min 2 min 和 5 min 不同时间点组; 于大脑中动脉线栓阻闭(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 90 min 后, 分别在 15 s 30 s 1 min 2 min 和 5 min 进行再灌注/缺血处理, 反复三次。比较 IP 最佳时间与 IPC 脑保护效应实验分组 SD 大鼠 30 只, 随机分为 3 组, 每组 10 只。对照组: 行单纯缺血再灌注 IP 最佳时间组和 IPC 组; 事先给予大脑中动脉阻闭 20 min, 再灌注 24 h 后行 MCAO 90 min。

1.2.2 模型制作 所有实验动物术前 24 h 禁食, 自由饮水。按文献 [3] 的方法制作大鼠局灶性脑梗死模型, 面罩给予 40 mL/L 异氟醚麻醉, 术中保留自主呼吸, 取颈正中切口, 暴露右侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉。结扎颈总动脉、颈外动脉, 于颈总动脉分叉下方剪一切口, 将一预先用酒精灯烧成圆头的 3-0 尼龙线置入颈内动脉 17 ~ 18 mm, 直到有轻微阻力感为止, 阻闭 90 min 后抽出尼龙线, 恢复再灌注。IP 于 MCAO 90 min 后, 将尼龙线拔出 5 ~ 8 mm, 依据分组, 再灌注时间于 15 s 30 s 1 min 2 min 和 5 min 后, 再将尼龙线放入原位置, 缺血时间分别为 15 s 30 s 1 min 2 min 和 5 min, 反复三次。IPC 用动脉夹夹闭颈总动脉, 于颈外动脉分叉上方剪一切口, 将一预先用酒精灯烧成圆头的 3-0 尼龙线置入颈内动脉 17 ~ 18 mm, 直到有轻微阻力感为止, 阻闭 20 min 后抽出尼龙线, 恢复再灌注 24 h。

1.2.3 观测指标

1.2.3.1 神经行为学评估 麻醉苏醒后, 将动物放回鼠笼, 自由饮食。脑缺血再灌注后 24 h, 按文献 [4] 的方法双盲法评估记录神经功能障碍评分 0 级: 无功能障碍 1 级: 不能伸展左侧前肢 2 级: 向左侧旋转 3 级: 向左侧倾倒 4 级: 无自主活动伴有意识障碍 5 级: 死亡。

1.2.3.2 脑梗死灶测量 完成神经功能障碍评分后, 将动物用氯胺酮深麻醉后断头处死, 迅速取出鼠

脑, 置于冰盐水中 10 min, 取冠状面均匀切成 2 mm 厚脑片, 迅速放入 20 g/L 的 2,3,5-氯化三苯四唑 (TTC) 溶液(37℃) 中染色 30 min, 然后用 40 g/L 甲醛固定。24 h 后将脑片用数码相机拍照, 输入计算机, 采用双盲法用图像处理软件(ADOBE PHOTOSHOP 7.0) 计算梗死容积(粉红色区为正常脑组织, 白色区为梗死区)百分比, 即梗死灶占对侧正常大脑半球百分比。

统计学处理: 资料分析采用 SPSS 11.0 统计分析软件, 脑梗死容积以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 梗死容积百分比采用单因素方差分析及两两比较, 神经功能障碍评分比较采用 Kruskal-Wallis H 法后行 Bonferroni 校正, 再利用 Mann-Whitney 法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能障碍评分比较 术后所有动物均存活。缺血再灌注后动物均表现一定神经功能障碍。缺血再灌注 24 h 后, 在 IP 最佳时间的确定实验中, 与对照组相比, IP-15 s, 30 s, 1 min 和 2 min 组神经功能评分显著降低 ($P < 0.01$), 尤以 IP-15 s 组神经功能评分强于其它各组 ($P < 0.05$)。而 IP-5 min 组与对照组相比较差异无统计学意义 ($P = 0.739$, 表 1)。在 IP 与 IPC 脑保护效应比较的实验中, IP 组和 IPC 组神经功能评分显著低于对照组 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 1 IP 最佳时间确定的实验中大鼠再灌注 24 h 后神经功能障碍评分 ($n = 10$)

组别	神经功能障碍评分						中位数(最小值-最大值)
	0	1	2	3	4	5	
对照	0	0	5	5	0	0	2.5(2-3) ^a
IP-15 s	0	7	3	0	0	0	1(1-2) ^b
IP-30 s	0	5	5	0	0	0	1.5(1-2) ^{ba}
IP-1 min	0	4	6	0	0	0	2(1-2) ^{ba}
IP-2 min	0	5	5	0	0	0	1.5(1-2) ^{ba}
IP-5 min	0	0	4	6	0	0	3(2-3) ^a

^a $P < 0.05$ vs IP-15 s; ^b $P < 0.01$ vs 对照。

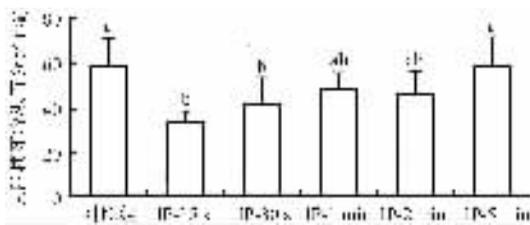
2.2 大鼠脑梗死容积变化 缺血再灌注 24 h 后, 在 IP 最佳时间的确定实验中, 脑梗死容积百分比 IP-15 s 组为 $(34.0 \pm 4.8)\%$, IP-30 s 组为 $(41.5 \pm 12.0)\%$, IP-1 min 组为 $(48.4 \pm 7.3)\%$, IP-2 min 组为 $(45.5 \pm 10.4)\%$, 明显小于对照组 [$(58.9 \pm 12.2)\%$, $P < 0.01$], 而 IP-5 min 组 $(58.4 \pm 9.6)\%$ 与对照组相比较差异无统计学意义 ($P = 0.922$)。IP-

15 s 组和 IP-30 s 组脑梗死容积显著小于其它各组 ($P < 0.05$, 图 1)。在 IP 与 IPC 脑保护效应比较的实验中, IP-15 s 组 (36.1 ± 10.3)% 和 IPC 组 (26.8 ± 3.3)% 脑梗死容积小于对照组 [(54.7 ± 9.5) %], $P < 0.01$ 。IP-15 s 组脑梗死容积大于 IPC 组 ($P = 0.018$, 图 2)。

表 2 IP 最佳时间与 IPC 脑保护效应比较的实验中大鼠再灌注 24 h 后神经功能障碍评分 ($n = 10$)

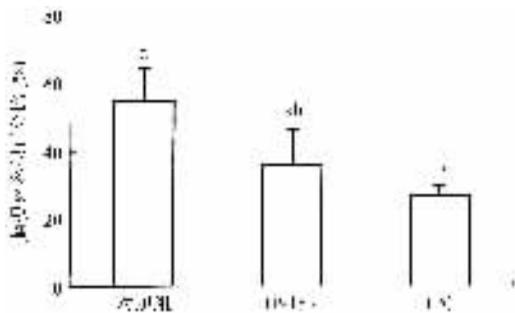
组别	神经功能障碍评分						中位数(最小值-最大值)
	0	1	2	3	4	5	
对照	0	1	7	2	0	0	2(1-3)
IP-15s	0	7	3	0	0	0	1(1-2)*
IPC	0	8	2	0	0	0	1(1-2)*

* $P < 0.05$ vs 对照。



* $P < 0.05$ vs IP-15 s; $^b P < 0.01$ vs 对照组。

图 1 IP 最佳时间确定的实验中大鼠再灌注 24 h 后脑梗死容积的比较



* $P < 0.05$ vs IPC, $^b P < 0.01$ vs 对照组。

图 2 IP 最佳时间与 IPC 脑保护效应比较的实验中大鼠再灌注 24 h 后脑梗死容积的比较

3 讨论

MCAO 模型和神经功能障碍评分是脑保护机制研究中最常用的技术平台,目前国际上应用颇为广泛^[3-4]。本实验应用 MCAO 模型,证实了短暂的 IP 可改善由于阻闭大鼠大脑中动脉所引起的神经功能改变并可降低脑梗死容积,这提示 IP 的最佳处理时间方案为 15 s,反复三次。但是,IP 的神经保护效应弱于 IPC。

目前关于 IP 减轻脑损伤机制尚不明。心脏的

初步研究显示,只有在缺血再灌注早期,IP 可以减轻炎症反应和改善氧自由基代谢^[5],激活再灌注损伤清除激酶信号^[6],抑制线粒体敏感性转化孔的开放,从而减少了细胞的凋亡和坏死,起到了器官的保护作用^[7-8]。而本实验恰恰证明了脑 IP 保护效应也在脑缺血再灌注的早期发生,并且明确了不同时间点所产生保护效应的强弱,得出了 IP-15 s 组脑保护效应最为明显,而 IP-5 min 组相对于其它时间点的 IP 属于最晚期的 IP 时间组,其对器官的保护效应消失。在兔心肌缺血再灌注模型于再灌注前 10 min 内实施 IP,可明显减小梗死面积,而延迟 10 min 则保护效应消失^[9]。因此,IP 对器官的保护在早期实行十分重要。但脑的 IP 具体保护机制是否与心脏一致,还有待进一步的研究证实。

IPC 主要施加于缺血之前,其主要是针对缺血性损伤和再灌注损伤给予的预防保护措施,可增加组织对缺血的耐受性。而 IP 则施加于复灌初期,只是作用于再灌注损伤初期,可能原因是 IPC 强于 IP 保护作用的原因所在。由于患者脑缺血发生的不可预知性大大影响了 IPC 在临床的可操作性,而 IP 则可克服此局限性,具有良好的临床应用前景,为今后揭示 IP 脑保护的分子机制以及临床应用提供了实验依据。

【参考文献】

- [1] Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: Ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(9): 1114-1121.
- [2] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: Comparison with ischemic preconditioning [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(2): H579-H588.
- [3] 熊利泽, 杨静, 徐宁, 等. 缺血后处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2005, 7(25): 508-510.
- [4] Zhang ZC, Zhang QZ, Cheng YN, et al. Antagonistic effects of ultra-low-molecular-weight heparin against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Pharmacol Res, 2007, 56(4): 350-355.
- [5] 高鹏, 熊利泽, 路志红, 等. 缺血后处理对兔脊髓缺血-再灌注损伤中 MDA 和 SOD 的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(14): 1273-1275.
- [6] Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, et al. Postconditioning: A form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway [J]. Circ Res, 2004, 95(3): 230-232.
- [7] Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, et al. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition [J]. Circulation, 2005, 111(2): 194-197.
- [8] Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning [J]. Cardiovasc Res, 2006, 70(2): 264-273.
- [9] Yang XM, Proctor JB, Cui L, et al. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways [J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 44(5): 1103-1110.

编辑 杨湘华